

WSPÓŁCZESNE KIERUNKI BADAŃ W ZAKRESIE MODYFIKACJI WARSTWY WIERZCHNIEJ BIOMATERIAŁÓW TYTANOWYCH PRZEZNACZONYCH NA ŚRÓDKOSTNE WSZCZEPY STOMATOLOGICZNE

RAFAŁ POKROWIECKI¹, BARBARA SZARANIEC², JAN CHŁOPEK², MAŁGORZATA ZALESKA¹

¹ ZAKŁAD CHIRURGII STOMATOLOGICZNEJ INSTYTUTU STOMATOLOGII UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO COLLEGIUM MEDICUM, UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW

² AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

Streszczenie

Celem pracy była charakterystyka współczesnych poglądów na zagadnienie warstwy wierzchniej i jej roli w procesie osteointegracji wszczepów stomatologicznych. Przedstawiono parametry powierzchni, które bezpośrednio wpływają na inicjację procesu integracji implantu oraz jego późniejsze funkcjonowanie w organizmie. Szczególną uwagę poświęcono zagadnieniu struktury powierzchni implantów dentystycznych oraz metodom modyfikacji umożliwiającym funkcjonalizację powierzchni z wykorzystaniem biomolekuł. Współczesne kierunki inżynierii powierzchni skupiają się na zwiększeniu biogodności materiałów metalicznych i intensyfikacji procesów osteointegracji w oparciu o zasady biomimetyki. Liczne badania *in vitro*, *in vivo* oraz wstępne badania kliniczne wskazują, że uzyskanie nanotopografii zapewnia szybszą osteointegrację implantów dentystycznych w porównaniu ze standardowymi wszczepami o powierzchni mikrostrukturalnej. Zastosowanie biomolekuł takich jak: kolagen, sekwencje peptydowe lub czynniki wzrostu przyspieszają procesy wgajania się implantów, co zostało również potwierdzone w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*. W pracy poruszony również został problem biofilmu bakteryjnego, który jest szczególnie zauważalny w implantologii stomatologicznej. Zjawisko kolonizacji powierzchni abiotycznych przez mikroorganizmy jest szczególnym problemem implantologii stomatologicznej. Ocenia się, że powstający na powierzchni implantu biofilm bakteryjny jest jedną z najczęstszych przyczyn utraty wszczepu. Dlatego też obserwuje się dążenia do opracowania nowych metod walki z zakażeniami okołowszczepowymi, wśród których szczególną uwagę poświęca się odpowiedniej modyfikacji warstwy wierzchniej. Obecnie uważa się więc, że oprócz osiągnięcia dobrej osteointegracji, biomateriały powinny wykazywać właściwości umożliwiające zahamowanie adhezji bakterii, a tym samym formowania biofilmu, który może być przyczyną utraty implantu.

Słowa kluczowe: tytan, modyfikacja powierzchni, implanty stomatologiczne, mikrostruktura, nanostruktura

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 2-10]

RECENT TRENDS IN SURFACE MODIFICATION OF THE TITANIUM BIOMATERIALS USED FOR ENDOOSSEUS DENTAL IMPLANTS

RAFAŁ POKROWIECKI¹, BARBARA SZARANIEC², JAN CHŁOPEK², MAŁGORZATA ZALESKA¹

¹ DEPARTMENT OF ORAL SURGERY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE – UNIVERSITY DENTAL CLINIC, UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKOW, POLAND

² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

Abstract

*The aim of this work is to present modern directions in the field of surface layer and its role in the process of dental implants osseointegration. The subject of analysis were parameters of the surface that directly initiate process of integration of the implant with the tissue and its further functioning in the body. The thorough attention was paid to the micro- and nano-structure of dental implant surface and the methods of its modification using biomolecules in order to make the implant functional. Another subject of the study was bacterial biofilm formation, which is particularly noticeable and dangerous in dental implantology. Having read the literature about modifications of titanium biomaterials surface, it can be concluded that modern trends in surface engineering focus on maximizing the biocompatibility of implants and their osseointegration on the basis of biomimetics. Numerous *in vitro*, *in vivo* tests and clinical research suggest that using nano-topographic materials results in faster osseointegration of dental implants in comparison with standard microstructure implants. Furthermore, introducing such biomolecules like collagen, peptide sequences or growth factors accelerate the implant healing process, which has been proven by *in vitro* and *in vivo* tests. The long-term implant functionality might also depend on using additional agents which prevent bacterial adhesion and subsequent formation of biofilm, leading to the implant loss.*

Keywords: titanium, surface modification, dental implants, microstructure, nanostructure

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 2-10]

Wstęp

Tytan od wielu lat z powodzeniem wykorzystywany jest w chirurgii kostnej. Znalazł zastosowanie między innymi w ortopedii, chirurgii szczękowo-twarzowej, a przede wszystkim w implantologii i implantoprotetyce stomatologicznej. W odróżnieniu od innych biomateriałów metalicznych tytan posiada niską gęstość i moduł Younga, wysoką odporność korozyjną i zmęczeniową, co korzystnie wpływa na jego właściwości biomechaniczne. Ponadto tytan charakteryzuje się zdolnością do samopasywacji czyli spontanicznego wytwarzania na jego powierzchni dwutlenku tytanu, który oddzielając metal od tkanki wpływa na wysoką biogodność tego materiału [1]. Oprócz biogodności, implant musi wykazywać kompatybilność mechaniczną oraz morfologiczną. Tylko wówczas możliwe jest prawidłowe wgojenie wszczepu określane mianem osteointegracji czyli funkcjonalnego połączenia wszczepu z żywą tkanką kostną [2-5].

Na przebieg osteointegracji bezpośrednio wpływa stabilizacja implantu w tkance kostnej, którą można podzielić na stabilizację pierwotną oraz wtórną. Stabilizacja pierwotna jest mechaniczną retencją wszczepu w kości. Na jej wartość mają wpływ czynniki związane z pacjentem takie jak: jakość i ilość tkanki kostnej, położenie anatomiczne wszczepu oraz stan ogólny pacjenta. Wśród właściwości implantu determinujących jego stabilizację pierwotną wymienić można: kształt, długość, średnicę oraz rodzaj i stan powierzchni [6].

Stabilizacja wtórna związana jest z biologicznym połączeniem powierzchni implantu z tkanką kostną oraz jej stałą przebudową na powierzchni wszczepu. Jej osiągnięcie jest wyznacznikiem prawidłowej osteointegracji i stanowi główny cel leczenia implantologicznego. Na stabilizację wtórną mają wpływ przede wszystkim właściwości fizykochemiczne warstwy wierzchniej implantu takie jak: topografia, chropowatość, skład chemiczny, zwilżalność i energia powierzchniowa. To one determinują procesy komórkowe zachodzące na powierzchni wszczepu prowadzące do uzyskania efektywnego połączenia na granicy kość-implant [1,7]. Problem osteointegracji jest szczególnie ważny w przypadku implantów dentystycznych. Współczesne techniki modyfikacji ich powierzchni skupiają się na możliwości przyspieszenia procesów prowadzących do uzyskania stabilnego połączenia wszczepu z tkanką kostną i utrzymaniu tego połączenia przez wiele lat, a tym samym zapewnieniu skutecznej rehabilitacji protetycznej pacjenta. W niniejszej pracy opisano kierunki badań w tym właśnie zakresie.

Zjawiska zachodzące na granicy implantu i tkanki kostnej

Tuż po wprowadzeniu implantu do wypreparowanego łoża, następuje zjawisko preadsorpcji czyli zwilżania powierzchni wszczepu płynem ustrojowym, a następnie adhezji białek pochodzących z płynu tkankowego oraz krwi takich jak: fibronektyna, witronektyna, laminina, albuminy oraz kolagen [8]. Obecna na powierzchni materiału warstwa protein jest niezbędna do zainicjowania adhezji komórek. Komórki poprzez liczne wypustki cytoplazmatyczne analizują strukturę materiału w poszukiwaniu odpowiedniego miejsca, w którym mogą łączyć się z adsorbowanymi białkami [9]. W procesie tym biorą udział integryny. Są to heterodimeryczne białka adhezyjne zbudowane z dwóch podjednostek: α i β . Część zewnątrzkomórkowa integryn łączy się z białkami macierzy pozakomórkowej, głównie poprzez ich sekwencję peptydową arginina-glicyna-kwas asparaginowy (RGD), tworząc płytki przylegania (*focal adhesions*) [10,11].

Introduction

Titanium has been successfully used in bone surgery for several years. It is employed in orthopaedics, face and jaw surgery, and above all - dental implantology. Unlike other metallic biomaterials, titanium is characterized by low density, relatively low Young's modulus and high corrosion and fatigue resistance which makes it a material with excellent biomechanical properties. Moreover, titanium is also prone to self-passivation i.e. spontaneous formation of a surface layer of titanium oxide which separates metal from tissue and results in its high biocompatibility [1]. Apart from biocompatibility, an implant must display mechanical and morphological compatibility as well. Only then it is possible to succeed in proper healing process called osseointegration i.e. establishing a proper structural and functional connection between the living bone and the implant [2-5].

Osseointegration is directly dependent on the process of stabilizing an implant in the bone tissue. The implant stability is achieved at two stages: primary and secondary. The primary stability comes from initial mechanical engagement with a bone tissue. Its success depends strictly on the patient's conditions: the bone quality and quantity, the anatomical location of an implant and the patient's general health. Also the properties of an implant - such as its type, shape, length, diameter, model and condition of the surface - determine the proper initial stability [6].

The secondary stability means a biological connection existing between the bone and the implant surface and is developed from regeneration and constant remodeling of the bone and tissue surrounding the implant after insertion. Implant stability plays a critical role in the process of osseointegration and remains the main objective of successful dental implant procedures. The secondary stability is affected by physical-chemical properties of the implant surface, such as: topography, roughness, chemical composition, wettability and surface energy. These are the factors determining cellular processes carried out on the surface of the implant that lead to establishing a successful bone/implant interface [1,7]. Osseointegration is particularly crucial in the case of dental implants. Modern techniques focus on modifying implant surface to accelerate the implant stability and make the implant/bone connection long-lasting, which means efficient prosthetic rehabilitation of a patient. Recent trends of such surface modifications research are presented in this work.

Phenomena happening on the implant/bone tissue interface

Right after inserting an implant into a prepared bony socket, the healing process follows in stages: pre-adsorption (keeping the implant surface wet with physiological fluid), protein adsorption, cell adhesion. The implant surface interacts with blood components and proteins from tissue fluid e.g. fibronectin, vitronectin, laminin, albumins and collagen [8]. The layer of proteins on the implant surface is requisite for initiating cell adhesion. Numerous cytoplasmic extensions of cells analyze the material structure in search of proper places to connect to adsorbed proteins [9]. The vital role in this process is played by integrins - heterodimeric cell adhesion receptors consisting of α and β subunit. The extracellular part of integrin binds to extracellular matrix proteins mainly through their peptide sequence arginine-glycine-aspartic acid (RGD), thus creating focal adhesions [10,11].

Wewnątrzkomórkowa część podjednostki β łączy się włókami cytoszkieletu, a te z lamininami zlokalizowanymi w jądrze komórkowym, bezpośrednio wpływając na ekspresję genów [12]. Jednostka β aktywuje kinazę płytek przylegania - FAK (*focal adhesions kinase*), która oddziałuje na białka cytoszkieletu oraz uruchamia szereg różnych ścieżek przekazywania sygnałów. Kinaza FAK, bierze udział w transdukcji bodźca mechanicznego na chemiczny, aktywując białka związane z drogami sygnałów wewnątrzkomórkowych takich jak: kinaza fosfatydyloinozytolu-3, fosfolipaza, kinazy białkowe aktywowane miogenami i inne. Kolejnym etapem osteointegracji jest proliferacja, a następnie różnicowanie komórek macierzystych w kierunku osteoblastów i produkcja osteoidu. Wszystkie te procesy są ściśle uzależnione od właściwości fizyko-chemicznych warstwy wierzchniej implantu, stąd też wyzwaniem na najbliższą przyszłość jest opracowanie i wytworzenie powierzchni, które pozwoliłyby na zintensyfikowanie procesu osteointegracji.

Metody modyfikacji powierzchni w celu intensyfikacji procesu osteointegracji

Modyfikacja mikro- lub nanostruktury

Pierwsze wszczepy wprowadzone w latach 70-tych zeszłego stulecia charakteryzowały się gładką powierzchnią. Liczne badania wykazały jednak, że implanty o powierzchni gładkiej (maszynowej) cechuje mniejszy stopień osteointegracji w porównaniu z materiałami chropowatymi, o większym rozwinięciu powierzchni.

Dotychczas powszechnymi metodami uzyskiwania powierzchni chropowatych były między innymi: wytrawianie roztworami kwasów lub zasad, piaskowanie, napylenie plazmy tytanowej, elektrodepozycja cząstek bioaktywnych takich jak np. HAp, TCP. Wszystkie wymienione metody umożliwiają wytworzenie mikrometrycznych nierówności powierzchni prowadząc do zwiększenia powierzchni kontaktu kości z implantem (BIC: *bone-to-implant contact*) [13,14]. Ponadto inkorporacja cząstek bioaktywnych ma na celu przyspieszenie procesów osteointegracji.

Nierówności powierzchni są najczęściej charakteryzowane poprzez współczynnik Ra. Jest on średnią arytmetyczną odchylenie profilu od linii średniej. Powierzchnie charakteryzujące się chropowatością (Ra) równą 1-2 μm sprzyjają wytworzeniu silniejszego połączenia implantu z tkanką kostną w porównaniu z powierzchniami gładkimi (o mniejszej wartości parametru Ra). Zapewniają one zwiększenie obszaru kontaktu z kością oraz odpowiednie rozłożenie nacisku na otaczające tkanki [15]. Natomiast na powierzchniach o zbyt wysokim współczynniku Ra obserwowano w warunkach *in vitro* obniżenie adhezji i proliferacji komórek ludzkich osteoblastów i zwierzęcych komórek linii MG-63. Powierzchnie takie mogą dodatkowo ułatwić uwalnianie jonów tytanu, zaburzać mineralizację tkanki kostnej i ostatecznie prowadzić do resorpcji tkanki kostnej podczas długotrwałego użytkowania wszczepu. Natomiast depozycja zbyt dużych cząstek bioaktywnych może, w skutek siły tarcia prowadzić do ich odrywania się i inicjowania stanu zapalnego. Obecnie coraz częściej można spotkać się z opiniami, że projektowanie powierzchni w oparciu wyłącznie o wartość współczynnika Ra jest błędne [1].

W związku ze złożonością procesów osteointegracji, w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie projektowaniem powierzchni na poziomie nanometrycznym [16,17]. Zaobserwowano, że w nanoskali pojawiają się specyficzne zjawiska, które nie występują w odniesieniu do materiałów mikrokrystalicznych [18]. Związane jest to ze zmianą właściwości termodynamicznych substancji.

The intracellular part of β subunit forms a connection to the cytoskeleton filaments which, on the other hand, interacts with laminins in the nucleus and directly affects gene expression [12]. Subunit β activates focal adhesions kinase (FAK) that influences proteins of cytoskeleton and triggers different signal transduction pathways. FAK takes part in the transduction of mechanical signal into the chemical one by activating proteins connected with intracellular signaling pathways, such as: phosphoinositide-3 kinase, phospholipase, mitogen-activated protein kinase and others. The next stage of osseointegration is proliferation and then differentiation of stem cells towards osteoblasts and the production of osteoid. All the above mentioned biological processes are rigorously dependent on physical and chemical properties of the implant surface. That is why elaboration and fabrication of such a surface that will facilitate more successful osseointegration is the goal for the nearest future.

Methods of modifying the surface in order to intensify osseointegration

Modification of micro- or nanostructure

The first implants introduced in the 1970s had a smooth surface. Nonetheless, numerous tests have proven that implants with smooth (machined) surface result in weaker osseointegration in comparison to the rough material with more developed surface.

There are several ways to obtain rough surfaces: acid- or alkali-etching, sandblasting, titanium plasma spray, bioactive molecules electrodeposition (e.g. HAp, TCP). All those methods are used to form micrometric irregularities on the surface in order to achieve a higher bone-to-implant contact (BIC) [13,14]. Besides, incorporation of bioactive molecules accelerates osseointegration.

Surface roughness is defined by Ra parameter – it is the arithmetic mean of the absolute departures of the roughness profile from the mean line. Surfaces with 1-2 μm roughness indicator (Ra) tend to make a stronger bone-to-implant contact as compared to smooth surfaces (lower Ra). They provide a larger area of BIC and proper distribution of pressure on the surrounding tissue [15]. However, *in vitro* tests performed on surfaces with too high Ra values showed less adhesion and proliferation of human osteoblasts and animal cell line MG-63. Such surfaces may also facilitate titanium ions release, disturb bone mineralization and eventually lead to bone tissue resorption in the long-lasting implant usage. Due to friction force, depositing not small enough bioactive molecules may lead to their detachment and subsequent inflammation. Nowadays, it more often thought that designing the surface on the sole basis of roughness indicator Ra is not sufficient [1].

Due to osseointegration complexity, in the recent years nanometric design of surface has become worthy of interest [16,17]. It was observed that there are particular phenomena occurring at the nanoscale that do not happen in the case of microcrystalline materials [18]. They are connected with changes in thermodynamic properties of a given substance. The idea of applying nanometric modification of the surface implant is based on biomimetic approach. The main idea is that the implant structure should be as similar to the structure of the surrounding tissue as possible. The hierarchical structure of bone tissue must be taken into consideration in order to understand the importance of the surface layer in successful osseointegration process.

Idea zastosowania modyfikacji powierzchni implantów na poziomie nanometrycznym jest oparta o zasady biomimetyki, zgodnie z którymi materiał implantacyjny powinien jak najdokładniej przypominać budowę tkanki, w której się znajduje. Aby zrozumieć jak istotną rolę odgrywa warstwa wierzchnia w procesie osteointegracji należy zwrócić uwagę na hierarchiczną budowę tkanki kostnej, którą można scharakteryzować na trzech poziomach. Na poziomie makrostrukturalnym wyróżniamy kość zbitą oraz gąbczastą. Na poziomie drugim, mikrostrukturalnym: lamelle, osteony, systemy Haversa oraz komórki kostne. Na trzecim, nanostrukturalnym, który mieści się w zakresie od 1 do 100 nm spotykane są białka, włókna kolagenowe oraz kryształy hydroksyapatytów. Należy pamiętać, że to właśnie na poziomie nanostrukturalnym zachodzą specyficzne procesy ligand-receptor odpowiadające za adhezję komórek macierzystych do powierzchni wszczepu oraz organizację płytek przylegania, co zapoczątkowuje proces osteointegracji. Ilość, konformacja oraz dostępność białek z sekwencją RGD jest kluczowa w procesach przyłączania się komórek do powierzchni oraz ich aktywności metabolicznej.

Metody modyfikacji prowadzące do powstania nanotopografii oparte są również na powszechnie znanych metodach takich jak: piaskowanie, wytrawianie czy procesach elektrochemicznych, z tym wyjątkiem, że celem jest takie dobranie parametrów procesu, które umożliwią wytworzenie określonych nanostruktur jak: nanorurki, nanopory, nanorowki czy depozycję nanocząstek bioaktywnych (hydroksyapatyt, fosforan wapnia).

Dotychczas przeprowadzonych zostało wiele badań *in vitro* określających potencjalną przydatność nanostrukturalnych powierzchni w implantologii. Puckett i wsp. [19] opisali silniejszą adhezję komórek ludzkich osteoblastów na powierzchni nanometrycznej w porównaniu z konwencjonalną powierzchnią mikrostrukturalną. Podobne wyniki w swoich badaniach otrzymali Richert i wsp. [20], Webster i wsp. [21] oraz de Oliveira i wsp. [22]. Autorzy ci wykazali, że osteoblasty na strukturach nanometrycznych wykazują szybszą proliferację, różnicowanie oraz zwiększoną ekspresję genów związanych z procesami osteogenezy w porównaniu z konwencjonalnymi powierzchniami „chropowatymi”. Stwierdzili również, że na odpowiedź komórkową ma wpływ rodzaj nanofazy: kształt (np. nanodołki, nanorowki, nanorurki), organizacja i odległość pomiędzy jej elementami.

Yap i wsp. [23] twierdzą, że za szybszą adhezję komórek na nanopowierzchniach, odpowiada większa dostępność białek płynu tkankowego oraz krwi, z którymi komórki łączą się na powierzchni wszczepu. Białka zaadsorbowane na powierzchni nanometrycznej przez dłuższy czas zachowują swoją strukturę promując tym samym procesy adhezji komórek oraz przyczyniając się do ich większej aktywności metabolicznej. Nanostrukturalne powierzchnie charakteryzują się znacznie wyższą hydrofilnością oraz energią powierzchniową w porównaniu z powierzchniami mikrostrukturalnymi. Zwilżalność i energia powierzchniowa są najważniejszymi parametrami warstwy wierzchniej, które bezpośrednio wpływają na adhezję białek, a następnie komórek. Poprzez zwiększenie hydrofilności, wzrasta zatem biogodność biomateriału [24,25].

Majewski [26] w badaniach klinicznych określił wpływ zmodyfikowanej powierzchni wszczepów tytanowych na osteointegrację i związaną z nią stabilizację wtórną. W badaniu porównano implanty dentystyczne o powierzchni porowatej pokrytej nanocząstkami fosforanów wapnia z implantami o klasycznej mikroporowatej powierzchni. Wyniki wykazały, że u pacjentów u których zastosowano implanty z powierzchnią nanostrukturalną zaobserwowano szybszą osteointegrację i uzyskanie stabilizacji wtórnej wszczepów. Tym samym, możliwym była wcześniejsza odbudowa protetyczna na implantach, a zatem rehabilitacja pacjentów.

The bone tissue can be described on three levels. On the first macrostructural level there are two types of bone tissue: compact and spongy. On microstructural level there are: lamellae, osteons, Haversian canal and bone cells. On the third level – the nanostructural one (in the range of 1-100 nm) – there are proteins, collagen fibers and hydroxyapatite crystals. It is on this level where specific ligand/receptor processes take place. They are responsible for adhesion of matrix cells to the implant surface and organizing focal adhesions, which triggers osseointegration. Quantity, conformation and accessibility of proteins possessing RGD sequence are crucial for the process of cells attachment to the surface and their metabolic activity.

Modification methods to create nanotopography are based on sandblasting, etching and electrochemical processes. The aim is to find such parameters as to obtain certain nanostructures like: nanotubes, nanopores, nanogrooves or to deposit bioactive nanomolecules (hydroxyapatite, tricalcium phosphate).

Many *in vitro* tests have been performed so far to describe potential application of nanosurfaces for implantology. Puckett et al. [19] described stronger adhesion of human osteoblasts on nanostructural surface in comparison to conventional microstructure surface. Similar research results were obtained by Richert et al. [20], Webster et al. [21] and de Oliveira et al. [22]. These authors proved that osteoblasts on nanostructures show faster proliferation, differentiation and higher gene expression connected with osteogenesis as compared to traditional 'porous' surfaces. They also found out that cell response is affected by a kind of nanophase: shape (nanoholes, nanogrooves, nanotubes), organization and distance between its elements.

Yap et al. [23] claim that faster adhesion of cells on nanostructures is caused by better accessibility of tissue fluid and blood proteins to which cells bind on the implant surface. Proteins adsorbed on nanometric surface retain their structure for longer period of time, thus promoting cell adhesion and their metabolic activity. Nano-textured surfaces are far more hydrophilic and have higher surface energy in comparison to microstructural ones. Wettability and surface energy are the most important parameters of surface layer as they directly affect proteins adsorption and then cells adhesion. A higher level of hydrophilicity improves biocompatibility of a material [24,25].

In his clinical research Majewski [26] determined how modified surface of titanium implants influences osseointegration and then the implant secondary stability. The research compared dental implants with classical microporous structure to the ones with the porous structure covered with calcium phosphate nanoparticles. The results showed that patients with nanostructured implants underwent faster osseointegration and earlier achieved the implant secondary stability. The conclusion was that prosthetic reconstruction and patients' rehabilitation could be accomplished earlier in the case of nanostructured implants.

Modifying chemical properties of the surface

Methods of obtaining micro- and nanotopography and incorporating inorganic bioactive molecules are presently employed to manufacture dental implants. Nonetheless, research is still conducted how to use organic compounds to achieve better biofunctionality of the implant surface. Such modern methods are much more complicated than the ones mentioned above. They are still experimental in nature and are not used in everyday medical practice.

In order to improve adhesion of cells to the surface, there are attempts to modify the surface using proteins naturally present in extracellular matrix that connect to integrins.

Modyfikacja właściwości chemicznych powierzchni

Metody prowadzące do powstawania mikro- lub nanotopografii oraz inkorporacji nieorganicznych cząstek bioaktywnych są obecnie najczęściej stosowane podczas produkcji wszczepów dentystycznych. Niemniej jednak prowadzone są również badania, których celem jest biofunkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem związków organicznych. Należy tutaj zaznaczyć, że są to metody znacznie bardziej skomplikowane niż opisywane wcześniej. Ponadto, mają one obecnie charakter eksperymentalny i nie są jeszcze wykorzystywane w codziennej praktyce lekarskiej.

W celu zwiększenia adhezji komórek do powierzchni prowadzi się próby modyfikacji powierzchni z wykorzystaniem białek naturalnie występujących w macierzy pozakomórkowej z którymi łączą się integryny. Pokrycie powierzchni wszczepu kolagenem czy fibronektyną przyspiesza proces adhezji osteoblastów [27,28]. Prowadzone są również badania nad zastosowaniem sekwencji peptydowych takich jak RGD. Jest ona sekwencją trzech aminokwasów: Arg-Gly-Asp która występuje w białkach takich jak: fibronektyna, fibrynogen, kolagen, osteopontyna z którymi łączy się osteoblasty [29-31]. Podejmowane są próby kontrolowania proliferacji, różnicowania oraz dojrzewania wybranych komórek stosując czynniki wzrostu takie jak: TGF- β , FGF, VEGF, PDGF, BMP. Imobilizacja białek i czynników wzrostu na inertej powierzchni implantu jest procesem trudnym, ponieważ tytan nie posiada odpowiednich grup funkcyjnych z którymi mogłyby wiązać się białka. Natomiast zbyt silne, nieodwracalne związanie białek z powierzchnią może ograniczać ich aktywność biologiczną. Kolejnym problemem jest ich inaktywacja lub zmiana struktury w wyniku oddziaływania z powierzchnią metalu. Aby umożliwić połączenie białek z biomateriałem, powierzchnię można poddać procesowi osadzania plazmowego, szczepiania, samoorganizujących się monowarstw. Powstałe na powierzchni grupy funkcyjne jak NH_2 , SH, SiH czy krótkie łańcuchy węglowodorowe mogą reagować z łańcuchami białek, co umożliwia zatrzymanie ich na powierzchni materiału. Inną metodą jest modyfikowanie białek i czynników wzrostu poprzez ich łączenie z tzw. aptamerami (oligonukleotydami lub peptydami) które wiążą się specyficznie z określoną cząsteczką [32,33]. Umożliwiają one wytworzenie połączenia, którego stabilność zależy od pH środowiska. Przyłączanie aptameru do powierzchni odbywa się w środowisku o neutralnym pH, natomiast w kwaśnym następuje jego odłączanie. Odwracalność imobilizacji powoduje, że białka nie są zbyt silnie związane ze strukturą materiału. Dzięki temu zachowują swoją strukturę i aktywność w środowisku tkankowym [34]. TBP-1 (*Titanium Binding Protein*) to aptamer wykazujący zdolność przyłączania się do tytanu [35]. Połączenie TBP-1 z cząsteczką BMP może umożliwić jej imobilizację na powierzchni z zachowaniem właściwości osteoindukcyjnych [36].

Alternatywną metodą jest osadzanie biomolekuł z wykorzystaniem warstw pośrednich w postaci polimerów. Polimery pochodzenia naturalnego takie jak chitozan są od wielu lat wykorzystywane w medycynie. Nie wykazują właściwości immunogennych oraz posiadają właściwości bakteriobójcze. Chitozan jest biodegradowalnym polimerem otrzymywanym w procesie deacylacji chityny. Jest nierozpuszczalny w wodzie oraz posiada udowodnione właściwości sprzyjające adhezji osteoblastów oraz fibroblastów. Stosowany jest jako element podłoża do regeneracji tkanki kostnej bądź jako samodzielny nośnik dla materiałów kościozastępczych. Możliwe jest również zastosowanie innych polimerów jak kwas hialuronowy, dekstran, alginiany oraz syntetyczne bioresorbowalne polimery jak polilaktyd czy poliglikolid [37,38]. Zastosowanie polimeru umożliwia inkorporację biomolekuł, które są stopniowo uwalniane do tkanki kostnej podczas stopniowej resorpcji polimeru, co intensyfikuje procesy osteointegracji.

Coating the implant surface with collagen or fibronectin accelerates the process of osteoblasts adhesion [27,28]. Also application of peptide sequences such as RGD is tested. RGD is the sequence of three amino acids arginine-glycine-aspartic acid which is present in many proteins that osteoblasts connect to (such as fibronectin, fibrinogen, collagen, osteopontin) [29-31]. There are attempts to control proliferation, differentiation and maturation of particular cells by applying growth factors such as: TGF- β , FGF, VEGF, PDGF, BMP. Immobilization of proteins and growth factors on the inert implant surface is a difficult task because titanium lacks proper functional groups capable of binding proteins. However, too strong and irreversible connection of proteins to the surface might limit their biological activity. Another problem is protein inactivity or the change of their structure as a result of the metal surface influence. In order to make proteins bind to biomaterial, its surface might undergo the process of plasma assisted deposition, hooking together, self-organizing monolayers. Functional groups (e.g. NH_2 , SH, SiH) or short hydrocarbon chains which emerge on the surface can interact with chains of proteins attaching them to the surface of the material.

Another method of modifying proteins and growth factors is connecting them to so-called aptamers (oligonucleotides or peptides) which specifically bind to a particular molecule [32,33]. They establish a connection which stability depends on pH of the environment. Binding aptamers to the surface happens at neutral pH, while in the acid environment aptamers detach. Reversible immobilization makes proteins loosely connected to the structure of the material. Thanks to it, they retain their structure and activity in the tissue environment [34]. TBP-1 (Titanium Binding Protein) is an aptamer capable of binding to titanium [35]. Connecting BMP to TBP-1 may immobilize it on the surface while retaining its osteoinductive properties [36].

The alternative method is fixing biomolecules using intermediary layer – polymers. Polymers of natural origin such as chitosan have been long used in medicine. They do not show immunogenic properties and they are bactericidal. Chitosan is a biodegradable polymer obtained in the process of chitin deacylation. It is insoluble in water and is proved to favor adhesion of osteoblasts and fibroblasts. It is used as an element of substrate for bone tissue regeneration or as an independent scaffold for bone-replacing materials. Application of other polymers such as hyaluronic acid, dextran, alginans or synthetic biodegradable polymers e.g. polylactide or polyglycolide is also possible [37,38]. Polymers allow incorporation of biomolecules which are gradually released into the bone tissue during polymer resorption, which intensifies osseointegration.

Bacterial biofilm versus surface modification of titanium biomaterials

Bacterial biofilm formation is a key problem particularly in the case of dental implants in the environment of oral cavity. Bacteria adhesion to abiotic surfaces is a complex process ruled by three main mechanisms. Gristina [11] characterized three classes of interactions which affect bacterial colonization of the biomaterial: van der Waals forces, non-specific chemical bonds (e.g. hydrogen) and specific chemical bonds (protein ones). The processes that determine bacterial attachment are mediated by microbial proteins called adhesins. They make bacteria compete with osteoblasts for proteins adsorbed on the implant surface. However, they are not structures as specialized as integrins so they are less selective. The colonizing mechanisms of osteoblasts and bacteria differ. Unlike osteoblasts, bacteria do not need proteins on the surface to initiate cells adhesion.

Biofilm bakteryjny a modyfikacja powierzchni biomateriałów tytanowych

Problem formowania biofilmu bakteryjnego jest szczególnie istotny w przypadku implantów dentystycznych, które przebywają w środowisku jamy ustnej. Przyleganie bakterii do powierzchni abiotycznych jest procesem złożonym i obejmuje trzy główne mechanizmy. Gristina [11] wyszczególnił trzy klasy interakcji wpływających na kolonizację biomateriału przez bakterie: siły van der Waalsa, wiązania chemiczne niespecyficzne (np. wodorowe), wiązania chemiczne specyficzne (białkowe). Za wiązania specyficzne odpowiada grupa białek bakteryjnych zwanych adhezynami. Obecność adhezyn sprawia, że bakterie konkurują z osteoblastami o białka adsorbowane na powierzchni wszczepu. Adhezyny nie są jednak strukturami tak wyspecjalizowanymi jak integryny i są przez to mniej selektywne. Cechą różnicującą mechanizmy kolonizacji powierzchni przez osteoblasty i bakterie jest fakt, że w przypadku tych drugich, obecność białek na powierzchni materiału nie jest niezbędna do zainicjowania adhezji komórek. Dużą rolę w kolonizacji bakterii odgrywają wiązania wodorowe i kowalencyjne oraz siły Van der Waalsa, które sprzyjają adhezji zarówno do materiału jak i między samymi komórkami bakteryjnymi [12].

Raz powstały biofilm bakteryjny nie może być usunięty przez naturalne mechanizmy obronne organizmu, ze względu na niezwykle złożoną strukturę. Poprzez produkcję egzo- i endotoksyn oraz produktów przemiany materii, bakterie zawarte w biofilmie indukują odpowiedź komórek immunokompetentnych. Reakcja zapalna oraz obecność toksyn prowadzi do destrukcji tkanki łącznej, resorpcji kości, obłuzowania wszczepu i w konsekwencji do jego utraty [14]. Niepowodzenie na skutek infekcji może wystąpić w każdym etapie postępowania leczniczego. W przypadku kontaminacji wszczepu podczas zabiegu istnieje ryzyko, że implant nie zintegruje się z tkanką i zostanie utracony. Mówimy wówczas o tzw. wczesnej utracie implantu. Jama ustna nigdy nie jest wolna od drobnoustrojów. W celu zminimalizowania ryzyka okołoperacyjnej kontaminacji wszczepu, pacjent poddawany jest ogólnoustrojowej profilaktyce antybiotykowej. Utratę wszczepu po uzyskaniu funkcjonalnego połączenia implantu z tkanką kostną określamy jako późną. Związana jest ona z obecnością zakażenia okołowszczepowego zwanego periimplantitis, które może postępować nawet przez wiele lat. Jego przyczyną jest biofilm bakteryjny gromadzący się na uzupełnieniach protetycznych osadzonych na wszczepach lub obecność mikroszczeliny powstającej pomiędzy wszczepem śródkostnym, a łącznikiem protetycznym. Na skutek destrukcyjnego oddziaływania bakterii dochodzi do uszkodzenia połączenia przetrzankowego. W dalszej kolejności, ze względu na brak ożębnej i mechanizmów obronnych, które występują w uzębieniu naturalnym, proces zapalny szybko obejmuje tkankę kostną i prowadzi do utraty implantu [15]. U pacjentów obciążonych chorobami ogólnoustrojowymi lub po przebytej radio- i chemioterapii okolicy głowy i szyi, ryzyko zakażenia jest znacznie większe.

Modyfikacja powierzchni prowadząca do powstania mikronierówności sprzyjających adhezji komórek, zwiększa również przyleganie bakterii i powstawanie biofilmu bakteryjnego. Pacjenci, u których zdiagnozowano zakażenie okołowszczepowe często poddawani są ogólnoustrojowej terapii antybiotykowej. Należy jednak mieć na względzie, że stosowanie antybiotyków może wyeliminować ostre objawy zakażenia, lecz nie będzie skuteczne w usunięciu przyczyny powstałego zakażenia tj. biofilmu bakteryjnego, który ze względu na swoją złożoną strukturę wykazuje znacznie wyższą odporność na antybiotyki niż bakterie w postaci planktonowej. Nagminne i często nieuzasadnione stosowanie antybiotyków sprzyja powstawaniu coraz większej liczby szczepów opornych.

Bacteria colonize the material by means of hydrogen and covalent bonds as well as van der Waals forces which bind bacteria not only to the host but to each other too [12].

Once-formed biofilm cannot be removed by natural bodily defence mechanisms because of its unusually complex structure. Bacteria which form the biofilm release exo-, endotoxins and metabolic waste inducing immunological response. Inflammatory reaction and the presence of toxins result in the damage of connective tissue, bone resorption, implant loosening and then its loss [14]. Complications due to an infection may happen at any stage of dental treatment. Bacterial contamination at implant insertion can be one of the factors leading to so-called early implant failure when the implant fails to integrate with the bone tissue. Oral cavity is never free of bacteria. In spite of proper preparation for the dental procedure and following all the aseptic and antiseptic rules, a patient is usually prescribed prophylactic antibiotics in order to eliminate the risk of perioperative infection. The late implant failure takes place after the implant became functionally connected to the bone but failed to maintain the achieved osseointegration. It is a result of periimplantitis – the destructive inflammatory process that may last for years. This microbiological complication is caused by bacterial biofilm forming on prosthetic devices fixed on implants or the presence of a microgap between the implant and the connecting element (in dentistry called abutment). Due to destructive activity of bacteria the intratissue connection gets damaged. Additionally, the absence of dentin and defence mechanisms of natural teeth makes inflammation quickly spread to bone tissue and leads to the loss of the implant [15]. It was also observed that patients with poor general health and the ones treated with radio- and chemotherapy in the head and neck area are more susceptible to infections and implant failures.

Modification of the surface creating micro-irregularities promotes adhesion of cells. Unfortunately, it also promotes adhesion of bacteria and biofilm formation. Periimplantitis is often considered as an indication for general antibiotic therapy. It is obviously efficient in depressing acute symptoms of inflammation, however it is not effective in reduction of biofilm on the implant surface as biofilm is highly resistant to commonly used antibiotics in comparison with planktonic bacteria cells. It is worth remembering that widespread use of antibiotics results in the growth of antibiotic-resistant bacteria. Additionally, with the administration of antibiotics adverse effects might occur such as nausea, diarrhea and even life-threatening allergic reactions.

Dental implants manufactured nowadays do not show local bactericidal properties. Internal hexagonal implant-to-abutment connection minimizes the emergence of the microgap and has a positive influence on establishing implant-tissue connection. Although it indirectly minimizes the risk of biofilm formation, still it does not entirely eliminate peri-implantitis (present in 5-8% of the cases) [39]. Surgical procedures to remove the bacterial biofilm from the surface and reduce inflammatory process do not eliminate the infection successfully. What is more, mechanical removal of the biofilm may also damage the structure of the implant and make the process of re-osseointegration impossible [40].

The aim of the research conducted in this field is assessing the relationship between the nanostructure and bacterial attachment and biofilm formation [41]. Puckett et al. [42] compared colonization of *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on nanotextured surface. The results showed that all nano-rough titanium plates were much less colonized than the plates with conventional machined surface. They also found out that proper modification applied to the titanium surface reduces the adhesion of bacterial cells.

Ponadto, może być przyczyną działań niepożądanych takich jak: nudności, dolegliwości żołądkowo-jelitowe czy odczyny alergiczne.

Współcześnie produkowane implanty dentystyczne nie wykazują miejscowych właściwości bakteriobójczych. Wewnętrzne połączenie heksagonalne pomiędzy wszczepem, a łącznikiem protetycznym zmniejsza powstawanie szczeliny brzeżnej oraz wpływa korzystnie na powstawanie połączenia przetkankowego. Co prawda pośrednio zmniejsza to ryzyko zalegania biofilmu, niemniej jednak nie wyeliminowuje całkowicie zjawiska *periimplantitis*, które obecnie występuje w 5-8% przypadków [39]. Zabiegi chirurgiczne mające na celu oczyszczenie powierzchni z biofilmu oraz redukcję stanu zapalnego nie są skuteczne w eliminacji raz powstałego zapalenia. Należy pamiętać również, że mechaniczne oczyszczanie powierzchni wszczepu może uszkodzić jego strukturę i uniemożliwić proces powtórnej osteointegracji [40].

Przeprowadzane w tym temacie badania mają na celu określenie wpływu nanotopografii na adhezję bakterii i formowanie biofilmu [41]. Puckett i wsp. [42] porównali przyłączanie się kolonii *S. aureus*, *S. epidermidis* oraz *P. aeruginosa* do powierzchni nanostrukturalnych. Wyniki badań wykazały, że wszystkie tytanowe płytki charakteryzujące się chropowatością na poziomie nanostrukturalnym zostały skolonizowane w znacznie mniejszym stopniu niż płytki z powierzchnią maszynową. Stwierdzili oni, że poprzez zastosowanie odpowiedniej modyfikacji powierzchni można uzyskać powierzchnię tytanu o właściwościach hamujących adhezję komórek bakteryjnych. Do podobnych wniosków w swoich badaniach doszli Whitehead i wsp. [43] Campoccia i wsp. [44] oraz Diaz i wsp. [45].

Opisywane wcześniej metody chemiczne również umożliwiają uzyskanie właściwości hamujących adhezję komórek bakteryjnych. Harris i wsp. [46] oraz Maddikeri i wsp. [47] wykazali, że powierzchnie tytanowe poddane biofunkcjonalizacji z wykorzystaniem sekwencji peptydowych RGD w połączeniu z resorbowalnym polimerem (kopolimerem kwasu mlekowego) sprzyjały szybszej adhezji osteoblastów, jednocześnie hamując przyłączanie się szczepów bakteryjnych z gatunków *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* oraz *S. mutans*. W innych badaniach oceniono przydatność połączenia resorbowalnych polimerów z różnymi antybiotykami (gentamycyna, ciprofloksacyna, wankomycyna) w modyfikacji tytanowych płytek do stabilnej osteosyntezy płytkowej (SOP) [48,49]. Ideą takiego połączenia było stopniowe, miejscowe uwalnianie antybiotyku podczas resorpcji polimeru. Pomimo skutecznych właściwości bakteriobójczych w warunkach *in vitro*, głównym problemem jest zjawisko wytwarzania szczepów opornych. Aby tego uniknąć, stężenie danego antybiotyku powinno być wyższe niż minimalne stężenie hamujące (*Minimal Inhibitory Concentration* - MIC) podczas przebywania implantu w organizmie. O ile w przypadku płytek do SOP, które zostają usunięte po wytworzeniu kośćciorostu utrzymanie odpowiednich wartości MIC do czasu osiągnięcia zespolenia odłamów jest możliwe, to w przypadku implantów dentystycznych jest to niewykonalne. W przeciwieństwie do płytek, implanty dentystyczne są wszczepiane na stałe i mają ciągły kontakt z bakteriami znajdującymi się w jamie ustnej. Aby zmniejszyć ryzyko wytwarzania szczepów opornych, zastosowano chlorheksydynę (Chlorhexidine-CHX) oraz czwartorzędowe związki amonowe (Quaternary ammonia compounds- QAC) w połączeniu z resorbowalnymi polimerami [47,51]. Związki te są powszechnie używane w stomatologii, dlatego podjęto próbę wykorzystania ich właściwości bakteriobójczych i hamujących rozwój biofilmu bakteryjnego w implantologii. Harris i wsp. [46] wykazali, że powłoki polimerowe zawierające CHX lub QAC, posiadają właściwości bakteriobójcze w stosunku do bakterii gram- dodatnich i gram- ujemnych.

The similar conclusions were reached by Whitehead et al. [43] Campoccia et al. [44] and Diaz et al. [45].

The chemical methods described earlier are also used to modify the surface in order to reduce bacterial adhesion. Harris et al. [46] and Maddikeri et al. [47] proved that bioactive RGD-modified titanium surfaces (with additional use of biodegradable copolymer of lactic acid) facilitated osteoblasts adhesion and reduced the adhesion of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* and *S. mutans*.

Other tests assessed suitability of combining resorbable polymers with different antibiotics (gentamicin, ciprofloxacin, vancomycin) to modify titanium plates in order to achieve stable osteosynthesis (SOP) [48,49]. The idea behind such combination was a gradual local delivery of antibiotics during the polymer resorption. In spite of efficient *in vitro* bactericidal properties, the main problem is the emergence of antibiotic-resistant bacteria. In order to avoid this phenomenon the concentration of antibiotics in the host should be higher than minimal inhibitory concentration (MIC). In the case of orthopedic plates being installed for a limited period of time retaining proper MIC in the host organism is possible. However, in the case of dental implants that are installed for infinite amount of time it is not possible, as they are constantly surrounded by bacteria in the mouth environment.

To reduce the emergence of antibiotic-resistant bacteria chlorhexidine (CHX) and quaternary ammonia compounds (QAC) were used in combination with resorbable polymers [46,50]. Such polymeric materials with antimicrobial activity are commonly used in dentistry, so it has been attempted to take advantage of their bactericidal properties in implantology as well. Harris et al. [46] showed that polymer coating containing CHX or QAC is effective against gram-positive and gram-negative bacteria. Still, a negative cytotoxic effect on human fibroblasts was observed, too. Yet another problem is creating a strong enough bond between the titanium implant and the polymer coating [2].

The problem of using silver and its derivatives has been thoroughly researched. Silver is well-known for its antimicrobial properties against gram-positive and gram-negative bacteria. Unfortunately, traditional silver compounds such as silver nitrate or silver sulfadiazine have numerous undesirable side effects and used as a component in biomaterial may result in inflammation of the surrounding tissue. A new approach of using silver in medicine has been proposed by nanotechnology which allows manufacturing silver particles of between 1 nm and 100 nm in size. Numerous tests proved that silver nanoparticles in low concentration have stronger bactericidal properties than traditional silver compounds. The high antimicrobial reactivity is caused by a small size and a big area of contact with bacteria cells [51,52]. It is also thought that – unlike in the case of antibiotics - bacteria are not able to develop resistance against metal nanoparticles. It is connected with multidirectional influence of metal nanoparticles on bacteria, such as: destruction of cell membrane and cell wall, interference with hemostasis, destructive influence on DNA and protein inactivation [53,54].

Incorporation of nanoparticles into the surface layer may be conducted in many manners, both using polymers or directly modeling the metallic biomaterial surface. Nonetheless, it has not been precisely concluded what is the cytotoxic effect of nanoparticles on osteoblasts and fibroblasts. Such an observation is mandatory to consider further application of metal nanoparticles to modify biomaterials for long-lasting implant applications e.g. dental implants.

Zaobserwowali oni natomiast występowanie efektu cytotoksycznego w stosunku do fibroblastów. Kolejnym problemem w zastosowaniu polimerów, jest wytworzenie wystarczająco silnego połączenia pomiędzy implantem tytanowym, a jego polimerową powłoką [2].

Innym sposobem nadania implantom właściwości antibakteryjnych jest zastosowanie srebra i jego pochodnych, które zostało dokładnie zbadane. Srebro znane jest ze swoich właściwości bakteriobójczych zarówno wobec bakterii gram-dodatnich jak i gram-ujemnych. Niestety klasyczne postacie związków srebra jak azotan srebra czy sole srebrne sulfadiazyny wykazują liczne działania niepożądane, a stosowane jako dodatek do biomateriałów mogą powodować stany zapalne otaczających je tkanek. Nowe spojrzenie na zastosowanie srebra w medycynie oferuje nanotechnologia, która umożliwia wytwarzanie cząstek metali o wielkości rzędu od kilku do 100 nm. Liczne badania wykazały, że nanocząstki srebra w niskich stężeniach wykazują silniejsze działanie bakteriobójcze niż klasyczne postacie srebra. Wysoka reaktywność nanocząstek, wynika z małego rozmiaru i dużej powierzchni oddziaływania z komórką bakteryjną [51,52]. Ponadto uważa się, że bakterie nie są w stanie rozwinąć lekooporności przeciwko nanocząstkom metali jak ma to miejsce w przypadku antybiotyków. Związane jest to z wielokierunkowym oddziaływaniem nanocząstek metali na komórkę bakteryjną takim jak: niszczenie błony i ściany komórkowej, zakłócenie hemostazy, destrukcyjne oddziaływanie na DNA oraz inaktywację białek [53,54]. Inkorporacja nanocząstek w warstwę wierzchnią może być przeprowadzona różnymi metodami, zarówno z wykorzystaniem polimerów jak i bezpośrednio na powierzchni biomateriału metalicznego. Wciąż nie określono natomiast jednoznacznie potencjalnego efektu cytotoksycznego nanocząstek w stosunku do osteoblastów i fibroblastów, co jest konieczne aby móc rozważyć zastosowanie nanocząstek metali w modyfikacji biomateriałów przeznaczonych na wszczepy długotrwałe jakimi są implanty dentystyczne.

Podsumowanie

Poprzez odpowiednią modyfikację powierzchni implantu można bezpośrednio wpływać na odpowiedź komórkową. Rodzaj, kształt oraz wzajemna relacja struktur przestrzennych na powierzchni bezpośrednio wpływają na adsorpcję białek, a następnie adhezję i aktywację komórek. Stan powierzchni oraz jej skład chemiczny warunkują intensywność procesów prowadzących do uzyskania osteointegracji implantu.

Obecnie uważa się, że nanometryczne powierzchnie o ściśle zaprojektowanym kształcie oraz topografii mogą selektywnie oddziaływać na określone receptory białkowe. Tym samym mogą regulować procesy osteointegracji prowadząc do szybszego uzyskania stabilizacji wtórnej wszczepu, której osiągnięcie jest głównym celem leczenia implantologicznego.

Kierunki rozwoju inżynierii biomateriałów koncentrują się obecnie na uzyskaniu osteoindukcyjnego charakteru powierzchni oraz intensyfikacji procesów komórkowych w celu wytworzenia szybszego i stabilniejszego połączenia implantu z tkanką. Powierzchnia wszczepu powinna również wykazywać właściwości bakteriobójcze aby zapobiegać ewentualnemu zakażeniu okolicy wszczepowemu w wczesnej fazie wgajania implantu oraz po uzyskaniu osteointegracji. Umożliwiłoby to ograniczenie stosowania antybiotyków oraz zwiększyło prawdopodobieństwo sukcesu leczniczego nawet wśród pacjentów z grup wysokiego ryzyka.

Na podstawie wyników badań *in vitro*, *in vivo* oraz wstępnych badań klinicznych, można stwierdzić, że w najbliższej przyszłości modyfikacja biomateriałów tytanowych z wykorzystaniem inżynierii powierzchni będzie dalej rozwijać się w oparciu o najnowsze osiągnięcia nanotechnologii.

Summary

Proper modifications of the implant surface can directly affect cellular response. The type, shape and the relationship of structures on the surface have a direct influence on proteins adsorption and then cells adhesion. The condition of the surface and its chemical constitution condition intensity processes leading to osseointegration.

The nanometric surfaces with precisely designed shape and topography may selectively influence specific protein receptors. In this way they regulate osseointegration processes resulting in earlier secondary implant stability - the main objective of successful implantologic treatment.

Modern trends in the development of biomaterial engineering concentrate on osteoinductive characteristics of the surface and intensification of cellular processes leading to establishing a faster and more stable implant/bone interface. The implant surface should also show bactericidal properties to prevent presumptive infection in the early phase of healing and after osseointegration. It would enable doctors to limit the administration of antibiotics and make medical procedures more successful even among high-risk patients.

Taking into consideration the results of *in vitro*, *in vivo* tests and preliminary clinical trials one can claim that engineering of titanium biomaterial surface will be developing on the base of nanotechnology in the nearest future.

Acknowledgements / Podziękowania

This work was financed by statutory research 11.11.160.256 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology.

Praca finansowana w ramach badań statutowych 11.11.160.256 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Piśmiennictwo

References

- [1] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej 2004.
- [2] Nałęcz M.: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000 T. 4. Biomateriały. Warszawa: PAN, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT 2003.
- [3] Williams D.F.: Definition of biomaterials. Progress in biomedical engineering. 4 ed. Amsterdam: Elsevier 1997.
- [4] Oshida Y., Tuna E.B., Aktoren, A., Gencay, K.: Dental Implant Systems. International Journal of Molecular Sciences 11 (2010) 1580-1678.
- [5] Szaraniec B., Chłopek J., Dynia G.: Porowate biomateriały tytanowe modyfikowane ceramiką bioaktywną. Inżynieria Materiałowa 30 (2009) 449-451.
- [6] Lioubavina-Hack N., Lang N.P., Karring T.: Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. Clin. Oral Impl. Res. 17 (2006) 244-250.
- [7] Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A., Lindstrom, J.: Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. Acta orthopaedica Scandinavica 52 (1981) 155-170.
- [8] Park B.S., Heo S.J., Kim C.S., Oh J.E., Kim J.M., Lee G., Park W.H., Chung C.P., Min B.M.: Effects of adhesion molecules on the behavior of osteoblast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces. Journal of Biomedical Materials Research Part A 74 (2005) 640-651.
- [9] Kuzyk P.R., Schemitsch E.H.: The basic science of peri-implant bone healing. Indian J Orthopaedics 45 (2011) 108-115.
- [10] Ruoslahti E.: RGD and other recognition sequences for integrins. Annual Review of Cell and Developmental Biology 12 (1996) 697-715.

- [11] Hynes, R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 (2002) 673-687.
- [12] Forgacs G.: On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signaling: an approach based on percolation. *J Cell Sci* 108 (1995) 2131-2143.
- [13] Jokstad A., Braegger U., Brunski J.B., Carr A.B., Naert I., Wennerberg A.: Quality of dental implants. *Int. Dent. J.* 53 (2003) 409-443.
- [14] Abrahamsson I., Zitzmann N.U., Berglundh T., Wennerberg A., Lindhe J.: Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 16 (2001) 323-332.
- [15] Wennerberg A., Albrektsson T.: Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 15 (2000) 331-344.
- [16] Shinnosuke O., Hiroyuki I., Atsushi N., Jun K., Hiroaki I.: Adhesion of osteoblast-like cells on nanostructured hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 591-597.
- [17] Manus J.P., Biggs R.G.R., Gadegaard N., Wilkinson C.D.W., Oreffo R.O.C., Dalby M. J.: The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-1⁺ enriched skeletal stem cells. *Biomaterials* 30 (2009) 5094-5103.
- [18] Jurczyk M., Jakubowicz J.: *Bionanomateriały*. Poznań: Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej 2008.
- [19] Puckett S., Pareta R., Webster T.J.: Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *Int J Nanomedicine* 3 (2008) 229-41.
- [20] Richert L., Vetrone F., Yi J.H., Zalzal S.F., Wuest J.D., Rosei F. et al.: Surface nanopatterning to control cell growth. *Adv Mater* 20 (2008) 1488-1492.
- [21] Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R.: Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 21 (2000) 1803-1810.
- [22] de Oliveira P.T., Nanci A.: Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 25 (2004) 403-13.
- [23] Yap F.L., Zhang Y.: Protein and cell micropatterning and its integration with micro/nanoparticles assembly. *Biosens Bioelectron* 22 (2007) 775-788.
- [24] Gittens R.A., Olivares-Navarrete R., Cheng A., Anderson D.M., McLachlan T., Stephan I., Geis-Gerstorf J., Sandhage K.H., Fedorov A.G., Rupp F., Boyan B.D., Tannenbaum R., Schwartz Z.: The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater* 9 (2013) 6268-6277.
- [25] Song D.P., Chen M.J., Liang Y.C., Bai Q.S., Chen J.X., Zheng X.F.: Adsorption of tripeptide RGD on rutile TiO₂ nanotopography surface in aqueous solution. *Acta Biomater* 6 (2010) 684-694.
- [26] Majewski P.: Wpływ rodzaju powierzchni tytanowych implantów dentystycznych na ich stabilizację w strukturach kostnych szczęki i żuchwy - rozprawa habilitacyjna. Kraków 2012.
- [27] Dolder J., Bancroft G.N., Sikavitsas V.I., Spauwen P.H., Mikos A.G., Jansen J.A.: Effect of fibronectin and collagen I-coated titanium fiber mesh on proliferation and differentiation of osteogenic cells. *Tissue Eng.* 9 (2003) 505-515.
- [28] Schulz M.C., Korn P., Stadlinger B., Range U., Möller S., Becher J., Schnabelrauch M., Mai R., Scharnweber D., Eckelt U., Hintze V.: Coating with artificial matrices from collagen and sulfated hyaluronan influences the osseointegration of dental implants. *J Mater Sci Mater Med.* (2013) Oct 11. [Epub ahead of print].
- [29] Harris L.G., Tosatti S., Wieland M., Textor M., Richards R.G.: Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* 25 (2004) 4135-4148.
- [30] Maddikeri R.R., Tosatti S., Schuler M., Chessari S., Textor M., Richards R.G., et al.: Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces. *J Biomed Mater Res* 84A (2008) 425-435.
- [31] Dee K.C., Andersen T.T., Bizios R.: Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. *J Biomed Mater Res* 40 (1998) 371-377.
- [32] Chatzinikolaidou M., Lichtinger T.K., Müller R.T., Jennissen H.P.: Peri-implant reactivity and osteoinductive potential of immobilized rhBMP-2 on titanium carriers. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 4405-4421.
- [33] Baneyx F., Schwartz D.T.: Selection and analysis of solid-binding peptides. *Curr Opin Biotechnol* 18 (2007) 312-317.
- [34] Sano K., Shiba K.: A hexapeptide motif that electrostatically binds to the surface of titanium. *J Am Chem Soc* 125 (2003) 14234-14235.
- [35] Kashiwagi K., Tsuji T., Shiba K.: Directional BMP-2 for functionalization of titanium surfaces. *Biomaterials* (2009) 1166-1175.
- [36] Modrzejewska Z.: Formy chitozanowe do zastosowań w inżynierii biomedycznej. *Inż. Ap. Chem.* 50 (2011) 74-75.
- [37] Renoud P., Tourny B., Benayoun S., Attik G., Grosgeat B.: Functionalization of Titanium with Chitosan via Silanation: Evaluation of Biological and Mechanical Performances. *PLoS ONE* 7 (2012): e39367. doi:10.1371/journal.pone.0039367
- [38] Marciniak J., Kaczmarek M., Ziębowicz A.: *Biomateriały w Stomatologii*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2008.
- [39] Berglundh T., Persson L., Klinge B.: A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol* 29 (2002) 197-212.
- [40] Rehman A., Hu J., Ott S.J., Grössner-Schreiber B.: Microbial community composition on modified dental implant surfaces: an in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 27 (2012) 811-819.
- [41] Colon G., Ward B.C., Webster T.J.: Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO₂. *J Biomed Mater Res A* 78 (2006) 595-604.
- [42] Puckett S.D., Taylor E., Raimondo T., Webster T.J.: The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials* 31 (2010) 706-713.
- [43] Whitehead K.A., Colligon J., Verran J.: Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids Surf B Biointerfaces* 41 (2005) 129-138.
- [44] Campoccia D., Montanaro L., Agheli H., Sutherland D.S., Pirini V., Donati M.E., et al.: Study of Staphylococcus aureus adhesion on a novel nanostructured surface by chemiluminescence. *Int J Artif Organs* 29 (2006) 622-629.
- [45] Diaz C., Schilardi P.L., Salvarezza R.C., Lorenzo F., de Mele M.: Nano/ microscale order affects the early stages of biofilm formation on metal surfaces. *Langmuir* 23 (2007) 11206-11210.
- [46] Harris L.G., Mead L., Müller-Oberländer E., Richards R.G.: Bacteria and cell cytocompatibility studies on coated medical grade titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 78 (2006) 50-58.
- [47] Maddikeri R.R., Tosatti S., Schuler M., Chessari S., Textor M., Richards R.G., Harris L.G.: Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces. *J Biomed Mater Res A* 84 (2008) 425-435.
- [48] Price J.S., Tencer A.F., Arm D.M., Bohach G.A.: Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 30 (1996) 281-286.
- [49] Lucke M., Schmidmaier G., Sadoni S., Wildemann B., Schiller R., Haas N.P., Raschke M.: Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 32 (2003) 521-531.
- [50] Davies R., Holt N., Nayagam S.: The care of pin sites with external fixation. *J Bone Joint Surg Br* 87 (2005) 716-719.
- [51] Oleszkiewicz A., Korzekwa K., Buga-Płoskońska G.: Nanocząsteczki w biologii i medycynie. *Laboratorium medyczne* 5 (2008) 30-33.
- [52] Cho K.H., Park J.E., Osaka T., Park S.G.: The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta* 51 (2005) 956-960.
- [53] Chen X., Schluesener H.J.: Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* 176 (2008) 1-12.
- [54] Wijnhoven S.W.P., Geertsma R.E. et al.: Nano-silver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3 (2009) 109-138.